

Sur la validité du sous-genre *Parvisepalum* (*Paphiopedilum*, Orchidaceae)¹

Hélène Chironⁱ, Guy Chironⁱⁱ & Guido Braemⁱⁱⁱ

Mots clés : analyse moléculaire, Orchidaceae, *Paphiopedilum*, *Parvisepalum*, relations phylogénétiques

Keywords: molecular analysis, Orchidaceae, *Paphiopedilum*, *Parvisepalum*, phylogenetic relationships

Résumé

Après avoir présenté les résultats de l'analyse moléculaire des séquences ITS de l'ADN ribosomique des espèces de *Paphiopedilum* du sous-genre *Parvisepalum*, les auteurs discutent l'opportunité d'organiser ce sous-genre en différentes sections.

Abstract

The results of the molecular analysis of the rDNA ITS sequences for the *Paphiopedilum* species of subgenus *Parvisepalum* are presented and the validity of organizing this subgenus into various sections is discussed.

Introduction

Le genre *Paphiopedilum* (Orchidaceae, Cypripedioideae) est généralement structuré en sous-genres, sections et sous-sections : Braem & Chiron (2003), par exemple, reconnaissent six sous-genres, dont, notamment, le sous-genre *Parvisepalum*, sujet de cet article. Dans leur étude de la sous-famille des Cypripedioideae, basée sur l'analyse moléculaire des séquences ITS de l'ADN ribosomique d'un très grand nombre de ses représentants, Cox *et al.* (1997) ont confirmé le caractère naturel de ce sous-genre, qui ne comprenait alors que 5 espèces : *P. armeniacum* S.C. Chen & L.Y. Liu, *P. delenatii* Guillaumin, *P. emersonii* Koopowitz & Cribb, *P. malipoense* S. C. Chen & Z. H. Tsi et *P. micranthum* T. Tang & F. T. Wang. Aucune section n'avait, à cette époque, été proposée.

1 : manuscrit reçu le 10 septembre 2004, accepté le 14 octobre 2004.

Depuis la publication de ce travail, deux espèces ont été décrites, en 1999, dans ce sous-genre : *P. hangianum* Perner & Gruss² et *P. vietnamense* Gruss & Perner³.

Récemment, dans Averyanov *et al.* (2003), Averyanov et Cribb ont organisé le sous-genre en deux sections⁴, en créant la section *Emersonianum* pour accueillir *P. emersonii* et *P. hangianum*, sur la base des caractères morphologiques suivants : « plantes grandes, sans stolons, à feuilles non tessellées, avec un labelle nettement plus petit que les pétales. »

Dans le présent article, nous complétons les résultats de Cox *et al.* grâce à l'analyse moléculaire des séquences ITS des deux espèces nouvellement découvertes, nous présentons l'arbre phylogénétique obtenu pour les 7 espèces que compte maintenant le sous-genre et nous en tirons les enseignements taxinomiques.

Matériel et méthode

Pour les espèces déjà étudiées par Cox *et al.*, nous avons bien entendu utilisé les séquences publiées par ces auteurs. Afin de vérifier qu'aucun biais n'était introduit dans les résultats par le fait d'utiliser des données d'origines différentes, nous avons réalisé le séquençage non seulement de *P. hangianum* et *P. vietnamense*, mais également de *P. emersonii*. Une quatrième espèce a été choisie, hors du sous-genre *Parvisepalum*, pour servir ultérieurement de taxon extérieur dans la reconstruction phylogénétique : cette espèce, *P. henryanum*, avait, elle aussi, été incluse dans l'étude de Cox *et al.*

Le matériel végétal utilisé pour notre étude consiste en quatre fragments de feuille prélevés sur quatre plantes cultivées dans les serres d'un producteur allemand, chez qui nous avons pu vérifier, par l'observation des fleurs, l'exactitude de leur identification.

2 : in *Die Orchidee*, suppl. 6:5.

3 : in *Die Orchidee*, suppl. 5:3.

4 : rappelons que la première création, dans un genre ou un sous-genre, d'une section particulière entraîne automatiquement celle de la section contenant l'espèce type du genre ou du sous-genre concerné (ici *P. delenatii*) ; cette section créée automatiquement porte le nom du genre ou du sous-genre, sans nom d'auteur : elle est dite autonome. (Code International de Nomenclature Botanique, 2000, art. 22.3).

Les techniques moléculaires mises en oeuvre pour le séquençage sont classiques ; elles comprennent trois phases successives : extraction d'ADN, amplification de la région utile, séquençage proprement dit.

Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir de 50-80 mg de tissu foliaire frais à l'aide du Kit de Purification d'ADN génomique WIZARD® (Promega) en présence d'azote liquide et selon les recommandations du fabricant. Après précipitation, le culot d'ADN est re-suspendu dans 100 µl d'H₂O distillée stérile.

Amplification d'ADN

La région ITS1-5.8rDNA-ITS2 a été amplifiée par réaction de polymérase en chaîne (PCR) dans un volume total de 50 µl, en présence de 1 µl d'ADN génomique, 2,5 unités de polymérase PfuTurbo® (Stratagene) et 100 ng de chaque amorce oligonucléotidique : une amorce sens (ITS1fw) se fixant sur la région 5' de la séquence ITS1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') et une amorce antisens (ITS2rv) se fixant sur la région 3' de la séquence ITS2 (5'-GGTTGCCTCACCTGACCTG-3'). Ces deux amorces ont été construites à partir de l'alignement des régions ITS1-5.8rDNA-ITS2 des espèces suivantes : *Paphiopedilum armeniacum* (n° accession Z78496), *P. delenatii* (Z78497), *P. emersonii* (Z78495), *P. malipoense* (Z78498) et *P. micranthum* (Z78499). Les conditions PCR ont été les suivantes : 30 cycles de 1 min de dénaturation (94°C), 1 min d'hybridation (52°C), 1 min 30 sec d'élongation (72°C), suivis de 30 min additionnelles d'élongation à 72°C en présence de 0,75 unité de polymérase Taq (Promega). Le produit d'amplification (fragment d'environ 0,7 kb) a été purifié sur gel d'agarose (Kit d'Extraction sur Gel QIAquick, Qiagen), puis ligué dans le vecteur pGEM-T easy (Promega).

Séquençage

La séquence ITS1-5.8rDNA-ITS2 de chaque taxon a été déterminée par séquençage des deux brins complémentaires d'ADN à partir d'au moins trois clones indépendants.

Les réactions de séquençage sont réalisées par la méthode de terminaison d'extension de chaîne (Sanger *et al.*, 1977) en présence de didéoxynucléotides marqués chacun par un fluorochrome différent (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), à

l'aide d'un robot Genesis Workstation 150 (Tecan). Les électrophorèses sont réalisées sur capillaires de 80 cm (3100 Capillary Array, Applied Biosystems) en utilisant le séquenceur 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Relations phylogénétiques dans le sous-genre

Les données

Les séquences de nucléotides de la portion d'ADN nucléaire ribosomique « ITS1, gène 5.8S et ITS2 » de l'ensemble des espèces de *Paphiopedilum* sous-genre *Parvisepalum* ont été réunies à partir des données obtenues par le premier auteur comme décrit ci-dessus, complétées par les données de Cox *et al.* (*loc. cit.*) publiées par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), sur le site Internet www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Le deuxième groupe de séquences concernent les espèces : *Paphiopedilum armeniacum*, *P. delenatii*, *P. ermersonii*, *P. malipoense*, *P. micranthum*, ainsi que *P. henryanum* et *Phragmipedium longifolium*, pris comme groupe externe.

Dans le premier groupe, on trouve les deux espèces décrites postérieurement au travail de Cox *et al.* : *Paphiopedilum hangianum* et *P. vietnamense*, ainsi que deux espèces déjà présentes dans le second groupe, à titre de contrôle : *P. emersonii* et *P. henryanum*.

La cohérence des données

On trouve aussi sur le site NCBI ci-dessus la même séquence « ITS1, 5.8S, ITS2 » pour *Paphiopedilum emersonii*, publiée par S.Y. Chung. Les trois séquences relatives à cette espèce ont été alignées grâce au logiciel MULTALIN (Corpet, 1988), disponible sur le site Internet npsa-pbil.ibcp.fr du Pôle BioInformatique Lyonnais (Combet *et al.*, 2000) et qui permet de visualiser les sites variables d'une séquence à l'autre. Dans la grande majorité des sites, les trois séquences sont identiques, mais, pour quelques uns, une des séquences présente une différence par rapport aux deux autres. Ainsi, la séquence de Cox *et al.* a présenté 18 différences avec les 2 autres contre 5 pour la séquence obtenue par le premier auteur. Nous avons donc décidé d'utiliser cette dernière pour la suite de l'étude.

Un deuxième test de cohérence a été réalisé en construisant un arbre phylogénétique, selon la méthode décrite ci-après, à partir d'un jeu de données dans lequel *P. emersonii* et *P. henryanum* étaient représentés deux fois (données de Cox *et al.* et données du présent article) : pour chacune des deux espèces, les deux spécimens sont bien groupés ; en outre, si l'on réduit chacune de ces paires à un seul taxon, l'arbre est identique à celui représenté sur la figure 1. Ceci tend à montrer qu'il n'y a pas de biais introduit par la double origine des données.

Le traitement des données

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), également disponible sur le site Internet du Pôle BioInformatique Lyonnais. Nous avons conservé aux paramètres leurs valeurs par défaut. La longueur totale de l'alignement est de 808 sites, dont 506 identiques sur les 9 séquences ; 14 sites, en fin de séquence, sont non utiles car indéterminés sur la majorité des séquences : seuls 288 sites sont informatifs sur le plan de la phylogénie. Pour les seules espèces du sous-genre *Parvisepalum* du genre *Paphiopedilum*, le nombre de sites variables est de 197.

Les séquences alignées ont été fournies comme données d'entrée au groupe de logiciels PHYLIP mis à disposition par l'Université de Washington, Seattle, USA (Felsenstein, 1989, 1993). Nous avons successivement utilisé :

- SEQBOOT (Boot-strapped sequences algorithm) : ce logiciel permet de créer, à partir d'un jeu de séquences d'entrée, N jeux de séquences de même longueur obtenus par échantillonnage aléatoire de la séquence d'entrée. Nous avons choisi N=100. Cette opération permet ensuite de réaliser le test dit du *bootstrap*, qui évalue la fiabilité des branches de l'arbre phylogénétique obtenu *in fine*.

- DNAPARS (DNA parsimony algorithm) : ce programme réalise un algorithme de parcimonie analogue à la parcimonie de Wagner sur des séquences d'ADN. Les hypothèses de base pour cette méthode sont classiques : (1) chaque site évolue indépendamment ; (2) les différentes lignées évoluent indépendamment ; (3) la probabilité de substitution d'une base sur un site donné est petite sur la période de temps concernée par une branche ; (4) les quantités de changements attendues le long de différentes

branches ne varient pas au point que la probabilité de deux changements dans une branche à fort taux de changement soit plus grande que la probabilité d'un changement dans une branche à faible taux ; (5) les quantités de changements ne varient pas d'un site à l'autre au point que la probabilité de deux changements sur un site soit plus grande que la probabilité d'un changement sur un autre.

Le nombre de changements dans la séquence nécessaires pour un arbre donné est calculé par la méthode de Fitch.

- CONSENSE (Majority-rule and strict consensus tree-program) : ce programme construit, à partir des arbres les plus parcimonieux obtenus en sortie de DNAPARS pour les N jeux de séquences, un arbre consensus qui contient les groupes monophylétiques qui apparaissent le plus souvent dans les arbres d'entrée. Il inscrit, à chaque embranchement, un nombre représentant le nombre de fois que le groupe d'espèces situé à droite de l'embranchement apparaît. Avec le choix fait plus haut de prendre N=100, ce nombre se lit comme un pourcentage.

Il est possible d'enraciner (artificiellement, précisons-le) l'arbre obtenu en désignant, parmi les espèces étudiées, celle qui sera placée à la racine (*outgroup*, en anglais ; ici, bien entendu, nous avons choisi *Phragmipedium longifolium*).

Les résultats

La reconstruction phylogénétique fournie par ces traitements est illustrée sur la figure 1. L'arbre consensus le plus parcimonieux⁵ a une longueur de 262 changements d'état. La valeur de *bootstrap* de chaque nœud est indiquée en caractères gras au-dessus de la branche, immédiatement à gauche du nœud ; le nombre de changements le long d'une branche est indiqué sous la branche. L'indice de cohérence est de 0,83 et l'indice de rétention de 0,94.

5 : rappelons que, en tant que construction historique (histoire de l'évolution), un arbre phylogénétique reste une hypothèse, qu'il convient de critiquer en fonction de toutes les données disponibles pour le groupe étudié.

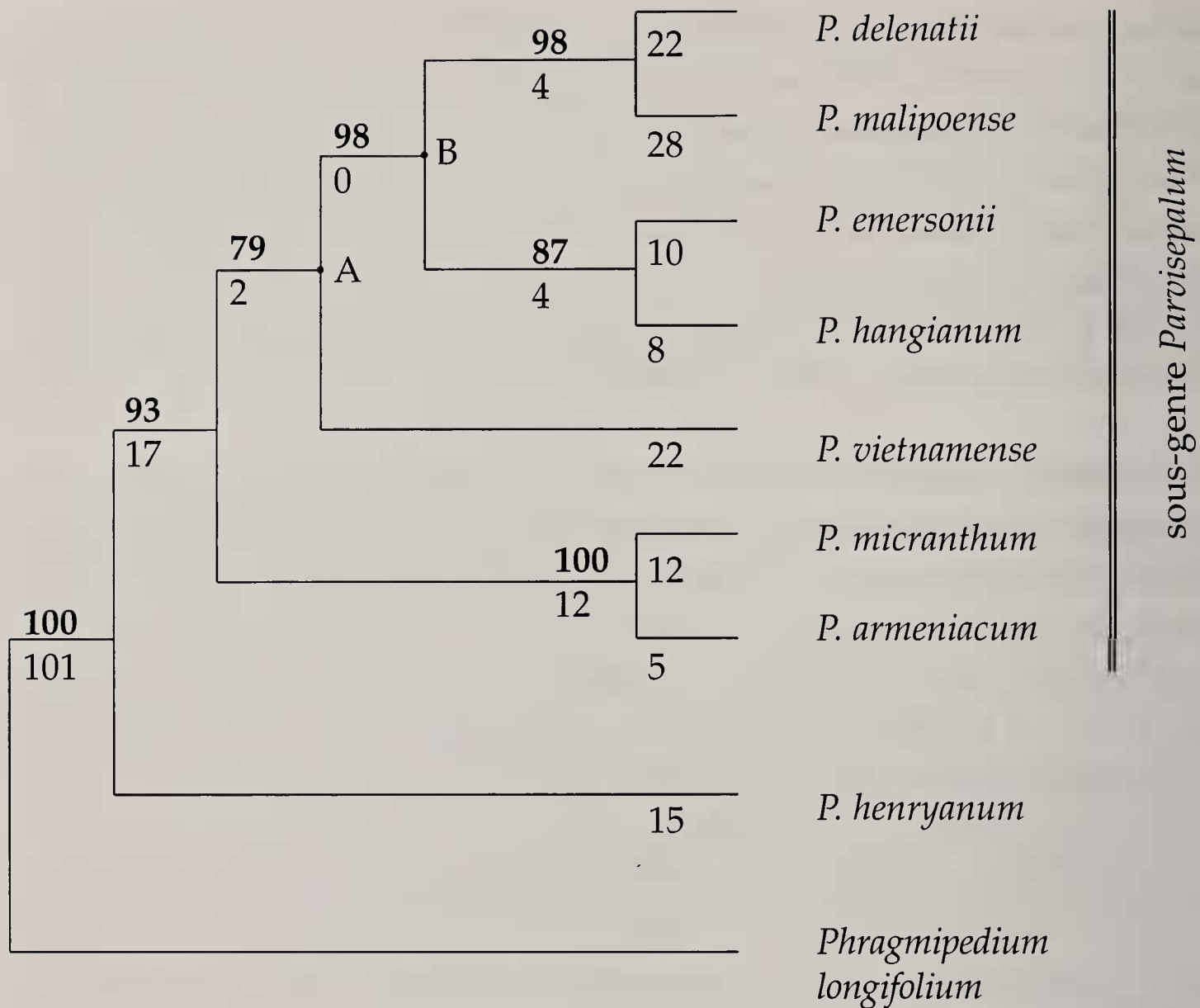


Fig. 1 : cladogramme des espèces de *Paphiopedilum* sous-genre *Parvisepalum*

Discussion

Le caractère naturel du sous-genre *Parvisepalum* est confirmé avec un *bootstrap* de 93%. Deux groupes apparaissent dans le cladogramme⁶ : le groupe « *armeniaccum-micranthum* », avec un *bootstrap* de 100% et le groupe constitué des cinq autres espèces. Le premier groupe existait déjà dans l'arbre publié par Cox *et al.* (*loc. cit.*), mais, pour ces auteurs, *P. emersonii*

6 : rappelons qu'un clade (ou groupe monophylétique) est constitué d'un ensemble d'espèces et de leur « ancêtre » commun, dont elles ont hérité certains caractères homologues, ou synapomorphies, par évolution à partir d'un groupe plus primitif. Ainsi, à partir de l'ancêtre commun à tout le sous-genre, le clade correspondant à l'ancêtre A et à ses descendants est défini par 2 changements de bases dans la séquence ITS (ce qui est bien peu).

était une espèce sœur du groupe « *armeniaccum-micranthum* », alors qu'ici la paire « *emersonii-hangianum* », supportée par un bootstrap de 87%⁷, se trouve intégrée dans le second groupe. Dans ce dernier, on retrouve, avec un bootstrap de 98%, la paire « *delenatii-malipoense* » déjà présente chez Cox *et al.* La cinquième espèce du groupe est *P. vietnamense*, dont la position n'est guère indiquée de manière plus précise par notre étude : la figure 1 l'indique comme espèce sœur du clade constitué par les 4 autres espèces, mais notons que la branche qui relie les nœuds A et B n'est définie par aucun changement d'état dans la séquence ITS ; nous pourrions donc tout aussi bien choisir une représentation graphique dans laquelle ces deux nœuds seraient confondus en une fourche triple, les trois ensembles « *delenatii-malipoense* », « *emersonii-hangianum* » et « *vietnamense* » étant alors vus comme 3 entités sœurs.

Soulignons à ce propos que la plupart des clades révélés par la figure 1 ne sont définis que par un faible nombre de changements d'état : seuls le sous-genre lui-même (17 changements) et la paire « *armeniaccum-micranthum* » (12 changements) échappent à cette règle.

Cette phylogénie ne conforte que partiellement l'opinion énoncée par Averyanov *et al.* (2003), selon laquelle (a) *P. emersonii* et *P. hangianum* sont proches (ce qui est confirmé) et (b) les espèces du sous-genre *Parvisepalum* se répartissent en deux sections : la section autonome⁸ *Parvisepalum* et la section *Emersonianum* Averyanov & Cribb (ce qui l'est beaucoup moins). En effet, si l'on reconnaît une section *Emersonianum* – ce qui n'est pas incompatible avec le cladogramme obtenu – il est nécessaire d'en créer au moins une autre, pour *P. micranthum* et *P. armeniaccum*, et peut-être même une quatrième pour *P. vietnamense*. Mais, avant de prendre position sur l'opportunité d'une telle approche, et puisque la présente étude inclut la totalité des espèces connues à ce jour dans le sous-genre *Parvisepalum*, il est intéressant de procéder à une lecture de l'arbre phylogénétique obtenu à la lumière des parentés suggérées par les caractères morphologiques.

7 : notons que, dans 12% des arbres calculés, *P. hangianum* est regroupé avec *P. delenatii* et *P. malipoense*.

8 : sur la notion d'autonome, voir le Code International de Nomenclature Botanique, articles 6.8 et 22.3. Voir aussi note 4.

Nous avons retenu pour cet exercice un petit nombre de caractères qui nous semblent constituer des marqueurs alpha-taxinomiques pertinents⁹ pour ce groupe de plantes (voir tableaux 1 et 2). Les relations phylogénétiques suggérées par ces quelques marqueurs morphologiques sont illustrées sur la figure 2, obtenue par la même méthode de parcimonie que le cladogramme de la figure 1, appliquée à des données binaires.

1	plantes avec (1) ou sans (0) stolons
2	feuilles fortement (11), faiblement (01) ou non (00) tessellées
3	feuilles linéaires-ligulées (0), oblongues-ovales (1)
4	feuilles charnues (1) ou non (0)
5	fleurs d'un diamètre < (0), > (1) 10 cm
6	fleurs à sabot rouge (1) ou non (0)
7	pétales plus larges que les sépales (1) ou non (0)
8	sabot avec (1) ou sans (0) auricules
9	sabot en forme de chausson (1) ou non (0)
10	marges de l'orifice du labelle pliées vers l'intérieur (1) ou non (0)
11	staminode nettement plié (1) ou non (0)
12	staminode orné (1) ou non (0) d'un ombon
13	staminode plus (1) ou moins (0) long que large
14	marges des feuilles denticulées (1) ou non (0)
15	sabot nettement tacheté (1) ou non (0)
16	pollen granulaire (0) ou cireux (1)

Tab. 1 : liste des caractères morphologiques retenus

armeniacum	11101001011000100
delenatii	01110011011000000
emersonii	00101001011101010
hangianum	00101101011000000
malipoense	11110101011000001
micranthum	11101011011101000
vietnamense	01110111011000000
henryanum	00000010100010000

Tab. 2 : matrice des caractères morphologiques

9 : les trois derniers caractères ne sont pas informatifs d'un point de vue phylogénétique, puisqu'ils sont stables sur l'ensemble du groupe sauf une espèce ; rappelons en effet que l'évolution correspondante, ne concernant qu'une espèce unique (autapomorphie), ne permet aucun rapprochement parental.

Le groupe « *delenatii-malipoense-vietnamense* » de la figure 2 est compatible avec le cladogramme de la figure 1. Par contre la paire « *emersonii-hangianum* » change de camp et rejoint la paire « *armeniacum-micranthum* ». Il n'y a donc qu'une cohérence partielle entre l'analyse morphologique et l'analyse moléculaire, probablement du fait du faible nombre de marqueurs alpha-taxinomiques retenus. En quoi donc les groupes suggérés par la phylogénie moléculaire sont-ils caractérisés d'un point de vue morphologique ?

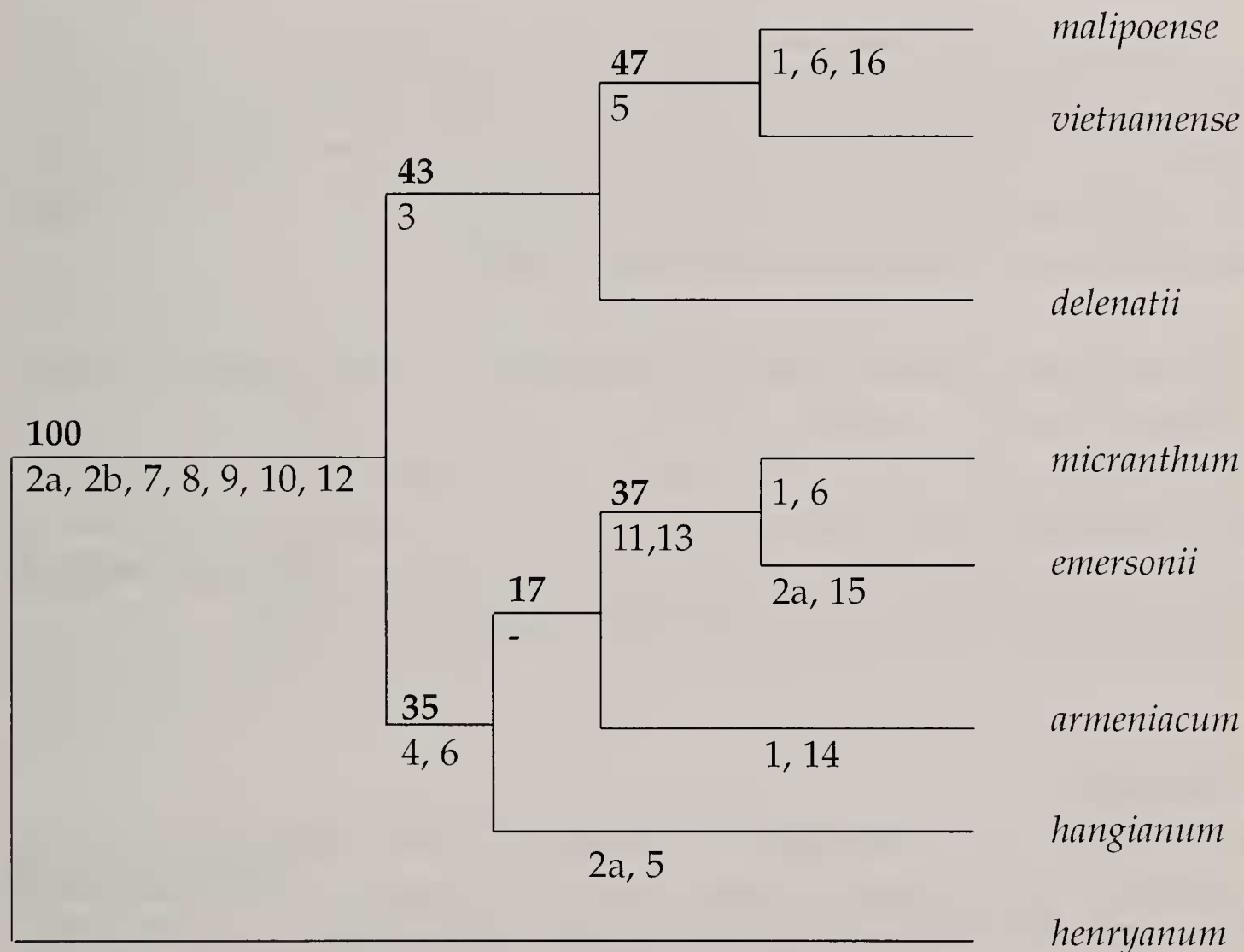


Fig.2 : relations suggérées par les caractères morphologiques retenus

* Le groupe « *armeniicum-micranthum* » possède des stolons (mais *P. malipoense* aussi), un feuillage fortement tessellé (mais le groupe « *delenatii-malipoense-vietnamense* » aussi), des feuilles ligulées et charnues (comme la paire « *emersonii-hangianum* ») et des fleurs plutôt petites (mais *P. emersonii* et *P. delenatii* aussi). En outre, *P. armeniicum* et *P. micranthum* se différencient fortement l'un de l'autre par la forme de leurs staminodes, dont l'importance dans le syndrome de pollinisation n'est plus à démontrer.

* Le groupe « *emersonii-hangianum* » est caractérisé par une absence de stolons (comme chez *P. delenatii* et *P. vietnamense*), un feuillage faiblement tessellé, des feuilles ligulées et charnues (comme la paire précédente) et un sabot non rouge (comme *P. armeniicum* et *P. malipoense*). Là encore, la forme du staminode sépare nettement ces deux espèces.

* Le groupe « *delenatii-malipoense-vietnamense* » est caractérisé par un feuillage fortement tessellé (comme « *armeniicum-micranthum* »), des feuilles oblongues-ovales et non charnues et un staminode moins long que large et nettement plié (mais *P. armeniicum* et *P. hangianum* également). Rappelons par ailleurs que *P. malipoense* s'écarte des deux autres espèces par ses stolons, sa fleur entièrement verte et son pollen cireux.

Conclusion

En définitive, si le sous-genre lui-même est bien différencié par un ensemble de traits morphologiques qui lui sont propres, il n'en est pas de même pour les différents sous-ensembles suggérés tant par l'analyse moléculaire des séquences ITS que par les principaux marqueurs alpha-taxinomiques (voir figure 2 pour ce dernier point) : ces sous-ensembles ne présentent que très peu, voire pas du tout, de synapomorphies.

Si l'on revient un instant sur la section *Emersonianum* Averyanov & Cribb, on s'aperçoit qu'elle n'est réellement définie que par un feuillage faiblement tessellé et par un ou deux autres caractères que l'on retrouve chez d'autres espèces du sous-genre n'appartenant pas à cette section. De même la section contenant *P. armeniicum* et *P. micranthum* – section qu'il serait nécessaire de

créer, si l'on acceptait la section *Emersonianum*, pour conserver à chaque groupe son caractère monophylétique – ne serait caractérisée par aucun trait propre à elle seule, même si ces deux espèces constituent le clade le mieux soutenu de notre analyse ITS. La section autonome n'aurait quant à elle, comme caractère propre, que la forme des feuilles, plus larges que chez les autres espèces.

Ceci ne nous semble pas suffisant pour soutenir la structuration du sous-genre en sections.

Le sous-genre *Parvisepalum* est en fait un groupe naturel, mais constitué d'un petit nombre d'espèces plutôt disparates, même si on les reconnaît instantanément comme membres du sous-genre ; espèces qui, certes, partagent deux à deux quelques caractères, mais qui ne se laissent pas séparer en groupes homogènes, supportés par de solides synapomorphies. Cette conclusion confirme l'opinion déjà exprimée par l'un d'entre nous (Braem, 2003) sur la base d'une approche plus traditionnelle du sous-genre.

Remerciements

Les auteurs remercient l'équipe Séquençage de la Génopole Montpellier-Languedoc-Roussillon qui a effectué gratuitement les séquençages de régions ITS nécessaires à cette étude.

Bibliographie

Averyanov, L., P. Cribb, Phan Ke Loc & Nguyen Tien Hiep, 2003. *Slipper Orchids of Vietnam*. Royal Botanic Gardens, Kew (UK).

Braem, G.J., 2003. *Paphiopedilum vietnamense* et quelques notes sur le genre *Paphiopedilum* sous-genre *Parvisepalum*. *Orchidées. Culture et protection*, 56:5-12.

Braem, G.J. & G.R. Chiron, 2003. *Paphiopedilum*. Ed. Tropicalia, Voreppe (France).

Combet C., C. Blanchet, C. Geourjon & G. Deléage, 2000. NPS@ : Network Protein Sequence Analysis, *TIBS* Vol. 25, No 3 [291]:147-150

Corpet F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucleic Acids Research*, 16 (22).

Cox, A.V., A.M. Pridgeon, V.A. Albert & M.V. Chase, 1997. Phylogeny of the slipper orchids (Cypripedioideae:Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 208:197-223.

Felsenstein, J., 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5:164-166.

Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribué par l'auteur, Université de Washington, Seattle (USA) – Department of Genetics.

Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463.

Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22).

i : Laboratoire Génome et Développement des Plantes, UMR 5096, Université de Perpignan - 66860 Perpignan

ii : 2 rue des pervenches, 38340 VOREPPE (France) – g.r.chiron@wanadoo.fr

iii : Research Associate - California Academy of Sciences (USA) & Schlechter Institute, Lahnau (Allemagne)